

	文件名称：岛津 LC-20AT 型高效液相色谱仪常见问题注意事项		编号：GGPT-SOP-207	
	编制	丁明	发布实施日期	2016-4-1

一、流动相

- 1.1 流动相应选用色谱纯试剂、高纯水或双蒸水，酸碱液及缓冲液需经过滤后使用，过滤时注意区分水系膜和油系膜的使用范围；
- 1.2 水相流动相需经常更换（一般不超过 2 天），防止长菌变质；

二、样品

- 2.1 采用过滤或离心方法处理样品，确保样品中不含固体颗粒；
- 2.2 用流动相或比流动相弱（若为反相柱，则极性比流动相大；若为正相柱，则极性比流动相小）的溶剂制备样品溶液，尽量用流动相制备样品液；
- 2.3 手动进样时，进样量尽量小，使用定量管定量时，进样体积应为定量管的 3~5 倍；

三、色谱柱

- 3.1 色谱柱在不使用时，应用甲醇冲洗，取下后紧密封闭两端保存；
- 3.2 不要高压冲洗柱子；
- 3.3 不要在高温下长时间使用硅胶键合相色谱柱；使用过程中注意轻拿轻放。

四、操作过程

- 4.1 先以所用流动相冲洗系统一定时间（如所用流动相为含盐流动相，必须先用水冲洗 20 分钟以上再换上含盐流动相），正式进样分析前 30min 左右开启 D 灯或 W 灯，以延长灯的使用寿命；
- 4.2 建立色谱操作方法，注意保存为自己命名的 Method，勿覆盖或删除他人的方法及实验结果；
- 4.3 使用手动进样器进样时，在进样前和进样后都需用洗针液洗净进样针筒，洗针液一般选择与样品液一致的溶剂，进样前必须用样品液清洗进样针筒 3 遍以上，并排除针筒中的气泡；
- 4.4 溶剂瓶中的沙芯过滤头容易破碎，在更换流动相时注意保护，当发现过滤头变脏或长菌时，不可用超声洗涤，可用 5% 稀硝酸溶液浸泡后再洗涤；
- 4.5 实验结束后，一般先用水或低浓度甲醇水溶液冲洗整个管路 30 分钟以上，

再用甲醇冲洗。冲洗过程中关闭 D 灯、W 灯；

4.6 关机时，先关闭泵、检测器等，再关闭工作站，然后关机，最后自下而上关闭色谱仪各组件，关闭洗泵溶液的开关；

4.7 使用者须认真履行仪器使用登记制度，出现问题及时向老师报告，不得擅自拆卸仪器。未经操作培训，不得擅自使用仪器。

五、注意事项

以下 12 条注意事项是自己在安装和使用液相色谱仪中的经验得出的，可能存在某些片面性，如有不当之处请多提宝贵建议。

5.1 流动相必须用 HPLC 级的试剂，使用前过滤除去其中的颗粒性杂质和其他物质(使用 0.45um 或更细的膜过滤)。

5.2 流动相过滤后要用超声波脱气，脱气后应该恢复到室温后使用。

5.3 不能用纯乙腈作为流动相，这样会使单向阀粘住而导致泵不进液。

5.4 使用缓冲溶液时，做完样品后应立即用去离子水冲洗管路及柱子一小时，然后用甲醇（或甲醇水溶液）冲洗 40 分钟以上，以充分洗去离子。对于柱塞杆外部，做完样品后也必须用去离子水冲洗 20ml 以上。

5.5 长时间不用仪器，应该将柱子取下用堵头封好保存，注意不能用纯水保存柱子，而应该用有机相(如甲醇等)，因为纯水易长霉。

5.6 每次做完样品后应该用溶解样品的溶剂(如甲醇)等清洗进样器。

5.7 C18 柱绝对不能进蛋白样品，血样、生物样品。

5.8 堵塞导致压力太大，按预柱→混合器中的过滤器→管路过滤器→单向阀检查并清洗。清洗方法：①以异丙醇作溶剂冲洗；②放在异丙醇中间用超声波清洗；③用 10% 稀硝酸清洗

5.9 气泡会致使压力不稳，重现性差，所以在使用过程中要尽量避免产生气泡。

5.10 如果进液管内不进液体时，要使用注射器吸液：通常在输液前要进行流动相的清洗。

5.11 要注意柱子的 PH 值范围，不得注射强酸强碱的样品，特别是碱性样品。

5.12 更换流动相时应该先将吸滤头部分放入烧杯中边振动边清洗，然后插入新的流动相中。更换无互溶性的流动相时要用异丙醇过渡一下。

高效液相色谱中常遇见的问题及处理方法

一、保留时间变化可能导致的原因（解决方法）

- 1.柱温变化（柱恒温）；
- 2.等度与梯度间未能充分平衡（至少用 10 倍柱体积的流动相平衡柱）；
- 3.缓冲液容量不够（用>25mmol/L 的缓冲液）；
- 4.柱污染（每天冲洗柱）；
- 5.柱内条件变化（稳定进样条件,调节流动相）；
- 6.柱快达到寿命（采用保护柱）。

二、保留时间缩短（解决方法）

- 1.流速增加（检查泵,重新设定流速）；
- 2.样品超载（降低样品量）；
- 3.键合相流失（流动相 PH 值保持在 3~7.5 检查柱的方向）；
- 4.流动相组成变化（防止流动相蒸发或沉淀）；
- 5.温度增加（柱恒温）。

三、保留时间延长（解决方法）

- 1.流速下降（管路泄漏,更换泵密封圈,排除泵内气泡）；
- 2.硅胶柱上活性点变化（用流动相改性剂,如加三乙胺,或采用碱至钝化柱）；
- 3.键合相流失（流动相 PH 值保持在 3~7.5 检查柱的方向）；
- 4.流动相组成变化（防止流动相蒸发或沉淀）；
- 5.温度降低（柱恒温）。

四、出现肩峰或分叉（解决方法）

- 1.样品体积过大（用流动相配样,总的样品体积小于第一峰的 15%）；
- 2.样品溶剂过强（采用较弱的样品溶剂）；
- 3.柱塌陷或形成短路通道（更换色谱柱,采用较弱腐蚀性条件）；
- 4.柱内烧结不锈钢失效（更换烧结不锈钢,加在线过滤器,过滤样品）；
- 5.进样器损坏（更换进样器转子）。

五、鬼峰（解决方法）

- 1.进样阀残余峰（每次用后用强溶剂清洗阀,改进阀和样品的清洗）；
- 2.样品中未知物（处理样品）；

- 3.柱未平衡（重新平衡柱,用流动相作样品溶剂（尤其是离子对色谱））；
- 4.三氟乙酸(TFA)氧化(肽谱)（每天新配,用抗氧化剂）；
- 5.水污染(反相)（通过变化平衡时间检查水质,用 HPLC 级的水）。

六、基线噪声（解决方法）

- 1.气泡(尖锐峰)（流动相脱气,加柱后背压）；
- 2.污染(随机噪声)（清洗柱,净化样品,用 HPLC 级试剂）；
- 3.检测器灯连续噪声（更换氙灯）；
- 4.电干扰(偶然噪声)（采用稳压电源,检查干扰的来源(如水浴等)）；
- 5.检测器中有气泡（流动相脱气,加柱后背压）。

七、峰拖尾（解决方法）

- 1.柱超载（降低样品量,增加柱直径采用较高容量的固定相）；
- 2.峰干扰（清洁样品,调整流动相）；
- 3.硅羟基作用（加三乙胺,用碱致钝化柱增加缓冲液或盐的浓度降低流动相 PH 值,钝化样品）；
- 4.柱内烧结不锈钢失效（更换烧结不锈钢,加在线过滤器,过滤样品）；
- 5.柱塌陷或形成短路通道（更换色谱柱,采用较弱腐蚀性条件）；
- 6.死体积或柱外体积过大（连接点降至最低,对所有连接点作合适调整,尽可能采用细内径的连接管）；
- 7.柱效下降（用较低腐蚀条件,更换柱,采用保护柱）。

八、峰展宽（解决方法）

- 1.进样体积过大（用流动相配样,总的样品体积小于第一峰的 15%）；
- 2.在进样阀中造成峰扩展（进样前后排出气泡以降低扩散）；
- 3.数据系统采样速率太慢（设定速率应是每峰大于 10 点）；
- 4.检测器时间常数过大（设定时间常数为感兴趣第一峰半宽的 10%）。

1.4 故障及解决方法

1.4.1 流动相脱气不充分

流动相受热，或者流动相不同组分混合时会有气体产生，气泡进入泵内引起压力波动，增加噪音，色谱图上出现毛刺。可试用下列方法解决问题：流动相再脱气；采用**更**有效的脱气方法或两种方法配合使用；改系统内混合**为**系统外预混合。

1.4.2 流动相供给不畅

流动相用完，管道中吸入气体引起泵压力不稳。应经常观察储液器中流动相的量，加足流动相保证所有的样品分析完毕。输液管道上装沉子沉至瓶底，储液器盖上留一小孔正好夹住进液管，使其不能上下移动。

过滤器阻塞引起管道和泵腔空化，压力不稳。过滤器应先用水超声，再用甲醇超声处理。这种情况下，流动相需要重新过滤。

1.4.3 流动相和储液器被污染

由于污染，噪音越来越大，检测器基线上升。污染物可能被泵以稳定的浓度打入系统，而再以稳定的浓度流出来，所以在色谱图中不出**多**余的峰。用梯度洗脱时弱流动相可以使污染物聚在柱顶，流动相强度增加后污染物可能被洗脱出来一个大的伪峰。有时基线噪音突然增大或突然提高，都是因为反复加进新的流动相或系统用得太久（通宵）所造成的。新加进的流动相有污染物或者流动相长霉，繁殖了细菌。

脏的储液器会污染清洁的流动相。每种流动相备有专用的储液器，或者定期报废储液器。已经污染的流动相一定要废弃掉。

4.2 清洗系统和关机

4.2.1 手动进样器清洗：

用注射器吸 20ml 超纯水后套上冲洗头，将清洗头轻轻顶在进样口上(不宜用力太大，否则容易损坏进样口)，使进样阀保持在 Inject 位置，慢慢将水推入，水将通过注射针导入口、引导管、注射针导入管和注射针密封圈，由样品溢出管排出。

尤其使用完缓冲盐流动相时，清洗时使用下面工具，先用注射器吸入 20 毫升蒸馏水，套上针头，插入泵头清洗管任意一端，推入蒸馏水，另一端流

入废液杯，重复 2~3 次即可！

4.2.2 色谱柱清洗：

继续以分析中使用流动相冲洗 10 分钟以上，待基线平稳后关闭检测器，冲洗色谱柱。如流动相不含缓冲盐，可以用甲醇：水=70：30（或用纯甲醇）直接冲洗 30 分钟以上后把流速设为零，然后关闭所有仪器设备，顺序为：先退出工作站软件，再依次关闭系统控制器、检测器、柱温箱、泵；如流动相含缓冲盐可先用纯水冲洗 10 分钟，再用甲醇：水=10：90 冲洗 20~30 分钟后，再用甲醇：水=70：30（或用纯甲醇）冲洗 30 分钟，观察泵压是否稳定，稳定后流速降为零后再关闭仪器各部分电源，然后关闭总电源离开实验室。